

HLAND

RECEIVED

JUN 25 2001

CH CENTER 1600/2900

zeichnung

dt/DE

nweis von Listerien

iedergabe der ur-

rkenamt

eihmoyr

Verfahren und Mittel zum Nachweis von Listerien

- 5 Die Erfindung betrifft Mittel und Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Listeria*, insbesondere von *L. monocytogenes*.

Die Mitglieder der Gattung *Listeria* sind grampositive stäbchenförmige Bakterien, die ubiquitär vorkommen. Zu dieser Gattung
10 gehören sieben verschiedene Arten: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. murrayi* und *L. grayi*. Von diesen ist nur *L. monocytogenes* pathogen für Menschen, gefährdet sind insbesondere Neugeborene, Schwangere und Ältere, sowie Patienten unter Immunsuppression. Häufig verlaufen Infektionen mit
15 *L. monocytogenes* tödlich.

Die Ursache für Infektionen mit Listerien sind häufig kontaminierte Lebensmittel, in denen sich die Keime selbst bei niedrigen Temperaturen um 4°C vermehren können. So wurden verschiedene
20 Listerien-Epidemien auf den Verzehr von kontaminierten Nahrungsmitteln, wie z.B Rohmilch, Käse oder Krautsalat, zurückgeführt. Schnelle Nachweisverfahren für den Nachweis von Listerien, insbesondere in Lebensmitteln oder klinischen Proben, sind also dringend erforderlich. Diese Verfahren müssen zudem zwischen *L.*
25 *monocytogenes* und den nicht-humanpathogenen Arten unterscheiden können. Weiterhin ist erforderlich, daß alle Varianten der humanpathogenen Art *L. monocytogenes* nachgewiesen werden können.

Der Nachweis von *L. monocytogenes* erfolgt in bekannter Weise
30 mittels Verfahren, die auf der Kultur der Mikroorganismen beruhen. Das in Int. J. Food Microbiol. 4 (1987), 249-256 beschriebene Verfahren dauert zwei Wochen. Ein etwas schnelleres Verfahren wird von der International Dairy Foundation (IDF) empfohlen; es dauert aber mindestens 6-8 Tage. Beide Verfahren sind wegen ihrer Dauer

für eine schnelle Identifizierung ungeeignet. Beide Verfahren sind zudem arbeitsintensiv, da für die Gewinnung von Einzelkolonien
5 Nährmedien mehrfach inokuliert werden müssen, und da anschließend die Isolate mittels biochemischer und serologischer Untersuchungsmethoden charakterisiert werden müssen.

Die bisher auf dem Markt befindlichen immunologischen Tests dauern
10 zwar nur wenige Stunden, erlauben jedoch nicht die wichtige Unterscheidung zwischen verschiedenen Arten von Listerien. Auch bei diesen Verfahren wird eine zweitägige Voranreicherungskultur benötigt.

15 In Appl. Environ. Microbiol. 54 (1988), 2933-2937 ist eine Methode beschrieben, bei der *L. monocytogenes* mit Hilfe von synthetischen Oligodesoxyribonukleotid-Sonden spezifisch nachgewiesen wird. Jedoch sind die verwendeten Sonden nicht ausreichend spezifisch, da sie auch mit der nicht human-pathogenen Art *L. seeligeri* reagieren.
20 Auch für dieses Verfahren ist eine vorherige Vermehrung der Keime notwendig: Lebensmittelproben bzw. deren Verdünnungen werden auf Agarplatten ausgestrichen, die beimpften Platten werden bebrütet und anschließend mit einer radioaktiv markierten DNS-Sonde im colony Hybridisierungsverfahren untersucht. Der Nachweis erfolgt
25 durch Autoradiographie. Auch diese Methode ist arbeits- und zeitaufwendig.

In Infect. Immun. 58, 1943-1950 (1990) wird die DNA-Sequenz des *iap*-Gens (invasion-associated protein) von *L. monocytogenes*
30 beschrieben. Dieses Gen kodiert ein Protein, das auch unter der Bezeichnung p60 bekannt ist, und das in Varianten in allen *Listeria* Arten vorkommt. Bei *L. monocytogenes* ist dieses Protein für die Fähigkeit, in tierische Zellen einzudringen, verantwortlich. Ein Polynukleotid (400 Basen) mit einer Teilsequenz aus diesem Gen ist

als DNA-Sonde geeignet, um *L. monocytogenes* von anderen Organismen zu unterscheiden.

5

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase-Chain-Reaction: PCR) erlaubt die in-vitro Vermehrung von Nukleinsäuren, eine Vorkultur ist bei diesem Verfahren im allgemeinen nicht notwendig. Damit die Reaktion gestartet werden kann, werden kurze Nukleinsäurestücke (primer) benötigt, die den zu vermehrenden Genomabschnitt eingrenzen. Üblicherweise werden zwei Primer benutzt, die mit jeweils einem Nukleinsäurestrang hybridisieren. Einer der Primer besitzt deswegen die Komplementärsequenz des jeweiligen Genabschnittes. Die Auswahl dieser Primer bestimmt die Spezifität der Nachweisreaktion. Für den Nachweis von *L. monocytogenes* ist dieses Verfahren in Appl. Environmental Microbiology 57, 606-609 (1991), in Letters Appl. Microbiol. 11, 158-162 (1990) und in J. Appl. Bact. 70, 372-379 (1991) beschrieben. Dort finden sich nähere Angaben zu den Einzelheiten dieser Verfahren. Die DNA-Primer binden an das Gen für Listeriolysin, dem Listeria- Hämolysin. Die Spezifität dieser Primer ist, wie aus Anmerkungen in J. Appl. Bact. 70 hervorgeht, zumindestens unsicher: *L. seeligeri* läßt sich nicht sicher von *L. monocytogenes* unterscheiden. Mit Hilfe der PCR-Technik ist somit der sichere Nachweis von *L. monocytogenes* bisher nicht möglich.

10
15
20
25

Polyklonale Antikörper gegen *L. monocytogenes* p60 reagieren auch mit dem Protein p60 von anderen, apathogenen Listerienarten. Derartige Antikörper sind deswegen ungeeignet, *L. monocytogenes* durch immunologische Verfahren spezifisch nachzuweisen. Es ist zwar prinzipiell möglich, ein derartiges polyvalentes Antiserum durch spezifische Absorption von störenden Antikörperfraktionen zu reinigen: Dazu wird Protein p60 von allen anderen Listeria-Arten an Träger kovalent gebunden. Die nicht erwünschten Antikörperfraktionen lassen sich spezifisch absorbieren; übrig bleibt ein

30
35

Antiserum, das nur noch mit Protein p60 aus *L. monocytogenes* reagiert. Diese Methode zur Gewinnung eines *L. monocytogenes* spezifischen Serums ist aufwendig: Man benötigt erhebliche Mengen von dem polyvalenten Antiserum als Ausgangsmaterial, sowie zusätzlich die iap-Genprodukte p60 von verschiedenen *Listerien*arten. Bei der Gewinnung von monoklonalen Antikörpern gegen Protein p60 würde dieser hohe Materialbedarf nicht auftreten, jedoch ist die Entstehung von Antikörpern gegen bestimmte Epitope zufallsbedingt: Zunächst muß eine große Zahl von antikörperproduzierenden Zellklonen hergestellt werden, aus denen dann geeignete Klone ausgewählt werden müssen. Es ist bisher nicht möglich, gezielt Antikörper gegen Epitope zu gewinnen, die für *L. monocytogenes* spezifisch sind.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, verbesserte Mittel und Methoden für die Differenzierung von Bakterien der Gattung *Listeria*, insbesondere für den Nachweis von Bakterien der Art *L. monocytogenes* bereitzustellen. Insbesondere werden erfindungsgemäß für die PCR-Technik geeignete Primer-Sequenzen, sowie Peptide zur gezielten Erzeugung von spezifischen Antikörpern, die für den immunologischen Nachweis von Bakterien der Art *L. monocytogenes* geeignet sind, bereitgestellt.

Gegenstand der Erfindung sind Primer, ausgewählt aus dem iap-Gen, für die Amplifikation von Nukleinsäuren, beispielsweise mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion, dadurch gekennzeichnet, daß die Primer als Teilsequenz mindestens eine Sequenz nach einer der Formeln Ia bis Ih und/oder eine zugehörige Komplementärsequenz enthalten, wobei vor und/oder hinter dieser Teilsequenz bis zu 20 weitere Nukleotidbausteine gebunden vorliegen können. Derartige Primer sind geeignet für den Nachweis und die Differenzierung von Bakterien der Gattung *Listeria*, insbesondere auch der Art *L. monocytogenes* mittels PCR.

	AATATGAAAAAAGC	Ia
	GCTTCGGTCGCGTA	Ib
5	ACAGCTGGGATTGC	Ic
	ACTGCTAACACAGCT	Id
	TAACAGCAATTCAAG	Ie
	CTGAGGTAGCGAGC	If
	AGCACTCCAGTTGTTA	Ig
10	GCAGTTTCTAAACCT	Ih

Besonders bevorzugt sind dabei Primer, die eine Sequenz nach einer der Formeln IIa bis IIh und/oder eine zugehörige Komplementärsequenz enthalten.

15	GTCGACTGAATATGAAAAAAGCAAC	IIa
	TTGGCTTCGGTCGCGTAGAATTCATA	IIb
	GCTACAGCTGGGATTGCGGT	IIc
	CAAAGTGCTAACACAGCTACT	IId
20	CAATAACAGCAATTCAAGTGC	IIe
	TAACTGAGGTAGCGAGCGAA	IIf
	ACTAGCACTCCAGTTGTAAAC	IIg
	CCAGCAGTTTCTAAACCTGCT	IIh

25 Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Peptide, die als Teilsequenz mindestens eine Sequenz nach einer der Formeln IIIa bis IIIe enthalten, wobei vor und/oder hinter dieser Teilsequenz bis zu jeweils sieben Aminosäuren peptidisch gebunden vorliegen können.

30	ProValAlaProThrGln	IIIa
	ThrGlnAlaThrThrProAla	IIIb
	AlaIleLysGlnThrAlaAsnThrAla	IIIc
	GlnGlnThrAlaProLysAlaProThr	IIId
	ValAsnAsnGluValAlaAlaAlaGluLysThrGlu	IIIe

35

Besonders bevorzugt sind dabei Peptide mit einer Sequenz nach einer der Abbildungen 2 a-i.

5 Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung eines der genannten Peptide mit einer Teilsequenz nach einer der Formeln IIIa bis IIIe zur Herstellung von immunogenen Konjugaten. Besonders bevorzugt sind für diesen Verwendungszweck Peptide mit einer
10 Sequenz nach einer der Abbildungen 2 a-i.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Antikörper, der ein Epitop bindet, das von dem Polypeptid nach Abbildung 3 gebildet wird, oder das ein Peptid nach einer der Formeln IIIa - IIIe, bevorzugt nach
15 einer der Abbildungen 2 a-i, enthält.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Antikörper, herstellbar durch Immunisierung eines Versuchstieres mit einem Polypeptid nach Figur 3 oder mit einem immunogenen Konjugat, welches ein Peptid mit
20 7 bis 24 Aminosäuren ausgewählt aus dem Polypeptid nach Fig. 3 enthält.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers gerichtet gegen das Protein p60 aus Listerien,
25 indem man ein Versuchstier mit einem Immunogen immunisiert und die Antikörper isoliert, dadurch gekennzeichnet, daß man als Immunogen ein Polypeptid nach Fig. 3 oder ein immunogenes Konjugat, das ein Polypeptid nach Fig. 3 enthält, verwendet. Bevorzugt sind dabei immunogene Konjugate, die ein Peptid mit 7 bis 24 Aminosäuren
30 ausgewählt aus dem Polypeptid nach Fig. 3 enthalten, oder die ein Peptid nach einer der Formeln IVa-IVe enthalten, worin
X³ und X⁴ jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff, eine beliebige Aminosäure oder ein beliebiges Oligopeptid mit bis zu
7 Aminosäuren
35 bedeuten.

	X ³ ProValAlaProThrGlnX ⁴	IVa
	X ³ ThrGlnAlaThrThrProAlaX ⁴	IVb
5	X ³ AlaIleLysGlnThrAlaAsnThrAlaX ⁴	IVc
	X ³ GlnGlnThrAlaProLysAlaProThrX ⁴	IVd
	X ³ ValAsnAsnGluValAlaAlaAlaGluLysThrGluX ⁴	IVe

10 Gegenstand der Erfindung ist schließlich die Verwendung eines Primers, der eine Teilsequenz nach einer der Formeln Ia - Ih oder bevorzugt eine Sequenz nach einer der Formeln IIa - IIh oder eine zugehörige Komplementärsequenz enthält, für den Nachweis von Bakterien der Gattung *Listeria*.

15 Gegenstand der Erfindung sind auch Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Listeria* mittels eines Primers, der eine Teilsequenz nach einer der Formeln Ia - Ih oder bevorzugt eine Sequenz nach einer der Formeln IIa - IIh oder eine zugehörige Komplementärsequenz enthält.

20 Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung eines Antikörpers, der gegen ein Epitop aus der Polypeptidsequenz nach Figur 3 gerichtet ist, oder der gegen eines der Epitope mit einer Aminosäuresequenz nach einer der Abbildungen 2 a-i gerichtet ist,
25 für den Nachweis von Bakterien der Gattung *Listeria*.

Gegenstand der Erfindung sind auch Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Listeria* mittels eines Antikörpers, der gegen ein Epitop aus der Polypeptidsequenz nach Figur 3 gerichtet ist,
30 oder der gegen eines der Epitope mit einer Aminosäuresequenz nach einer der Abbildungen 2 a-i gerichtet ist.

Gegenstand der Erfindung sind schließlich Testzusammenstellungen zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Listeria*, insbesondere der
35 Art *L. monocytogenes*, mittels Amplifikation von Nukleinsäuren,

beispielsweise mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion, die einen
Primer mit einer Teilsequenz nach einer der Formeln Ia - Ih oder
5 bevorzugt mit einer Sequenz nach einer der Formeln IIa - IIh oder
eine zugehörige Komplementärsequenz enthalten.

Gegenstand der Erfindung sind ferner Testzusammenstellungen zum
immunologischen Nachweis von Bakterien der Art *Listeria*
10 monocytogenes, in denen ein Antikörper, der gegen ein Epitop aus
der Polypeptidsequenz nach Figur 3 gerichtet ist, oder der gegen
eines der Epitope mit einer Aminosäuresequenz nach einer der
Abbildungen 2 a-i gerichtet ist, enthalten ist.

15 Figur 1 zeigt das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung von
Amplifikationsprodukten; die experimentellen Einzelheiten sind in
Beispiel 8 dargestellt.

20 Figur 2 a-i zeigen die Aminosäuresequenzen der besonders bevor-
zugten immunogenen Peptide ausgewählt aus der Sequenz des Proteins
p60 aus *Listeria monocytogenes*.

Figur 3 zeigt die Aminosäuresequenz des Polypeptides ausgewählt aus
25 der Sequenz des Proteins p60 aus *Listeria monocytogenes*, dessen
Epitope für den immunologischen Nachweis von Bakterien der Gattung
Listeria geeignet sind.

Figur 4 zeigt für Vergleichszwecke die Aminosäuresequenz des
30 Proteins p60 aus *Listeria monocytogenes*, die in zwei Teilabbildun-
gen a und b dargestellt ist.

Die Erfindung wird im folgenden näher beschrieben. Dabei wird in
35 der Regel auf Einzelheiten von biochemischen, immunologischen und

molekularbiologischen Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, und deren Einzelheiten in der Literatur beschrieben sind, nicht näher eingegangen. Bei diesen Verfahren kann man auch von an sich bekannten, hier nicht näher beschriebenen Varianten Gebrauch machen.

Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide nach den Formeln Ia - Ih und IIa - IIh sind als Primer für Nukleinsäureamplifikationsmethoden und somit zum spezifischen Nachweis von Bakterien der Gattung *Listeria* geeignet. Ihre Sequenzen sind in üblicher Weise vom 5'-Ende zum 3'-Ende geschrieben dargestellt. In Abhängigkeit von den Erfordernissen des jeweils verwendeten Amplifikationssystems werden entweder Desoxyribonukleotide oder auch Ribonukleotide mit den erfindungsgemäßen Sequenzen eingesetzt. Im letzteren Fall sind die Thymidinbausteine jeweils durch Uridinbausteine ersetzt. Dem Fachmann ist weiterhin bekannt, daß häufig der Austausch von einer oder weniger Basen in eine Nukleotidsequenz deren biologische Eigenschaften nicht verändert. Deswegen umfassen die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen auch solche, die durch Basenaustausch aus den Sequenzen Ia - Ih und IIa - IIh abgeleitet sind, und die biologisch dieselbe Wirkung wie der jeweilige Primer mit der Ursprungssequenz zeigen. Da üblicherweise je ein Primer mit jeweils einem der DNA-Stränge reagieren soll, wird einer der Primer in der komplementären Sequenz eingesetzt. Die komplementäre Sequenz ergibt sich in bekannter Weise nach den Regeln der Basenpaarung.

Basierend auf der jeweiligen Sequenz können die erfindungsgemäßen Oligonukleotide nach dem Fachmann bekannten Verfahren, beispielsweise der Phosphotriester- oder der Phosphoamidit-Methode, synthetisiert werden. Bevorzugt wird die Phosphoamidit-Methode benutzt, insbesondere unter Verwendung von mechanisierten Synthetizern. Die Methode ist in Tetrahedron Lett. (1981) 22 :

1859-1862 beschrieben. Weitere Einzelheiten derartiger Syntheseverfahren sind beispielsweise in Winnacker, E.L. (1985) Gene und Klone, Seite 44-61 (VCH-Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim),
5 beschrieben.

Die erfindungsgemäßen Primer sind geeignet für DNS-Amplifikation, beispielsweise mit Hilfe der Polymerase Chain Reaction (PCR). Dazu
10 wird die DNS durch Erwärmen zunächst in die Einzelstränge zerlegt. Es werden zwei Primer verwendet, die jeweils mit dem homologen DNS-Abschnitt auf jeweils einem DNS-Strang hybridisieren. Der Genomabschnitt, der zwischen diesen beiden Primern liegt, wird vermehrt. Die an die DNS angelagerten Primer stellen die Startpunkte für die
15 Amplifikation dar. Eine Polymerase, bevorzugt taq-DNA-Polymerase, ergänzt anschließend in Gegenwart der vier Nukleotidtriphosphate den zweiten Strang entsprechend der Sequenz der ursprünglichen DNA. Anschließend werden die entstandenen Doppelstränge wieder durch Erwärmen in die Einzelstränge zerlegt. Dieser Amplifikationszyklus
20 kann mehrfach wiederholt werden. Nach einer ausreichenden Anzahl von Amplifikationszyklen kann die amplifizierte Nukleinsäure mittels bekannter Methoden nachgewiesen werden. Dazu kann die DNS mittels Elektrophorese aufgetrennt, anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt und schließlich durch Fluoreszenz mittels UV-Anregung
25 nachgewiesen werden. Möglich ist auch der Nachweis mittels DNS-Hybridisierung. Die Einzelheiten geeigneter Amplifikations- und Nachweismethoden sind auch in Übersichtsartikeln, z.B. Innis et al. (eds.) PCR Protocols (Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich, Publishers) beschrieben. Ebenso sind andere Nukleinsäureamplifikationsverfahren, bei denen die erfindungsgemäßen
30 Primer benutzt werden können, aus der Literatur bekannt. Zu diesen gehört die Ligase-Ketten-Reaktion, beschrieben von Bond, S. et al..

- Die Auswahl der Primer nach den bevorzugten Formeln IIa - IIh bestimmt die Lage der Startpunkte auf dem iap-Gen und somit die
- 5 Spezifität der Nachweisreaktion: So erwiesen sich Kombinationen von Primern ausgewählt aus der Sequenz des iap-Gens als unspezifisch und folglich ungeeignet für den Nachweis von Listerien mittels DNA-Amplifikation (siehe dazu beispielsweise Spalte F in Tabelle 1). Jedoch erwiesen sich andere ausgewählte Kombinationen als spezi-
- 10 fisch für die Gattung Listeria, andere für Gruppen von Listeria-Arten, wieder andere für einzelne Listeria-Arten. Insgesamt ist die Auswahl und die Zusammenstellung der Primer also kritisch. Die Auswahl eines der beiden Primer ist stets besonders kritisch, während der zweite Primer eher variiert werden kann, ohne die
- 15 Spezifität der Nachweisreaktion nennenswert zu verändern. Folglich kann nach der Lehre der vorliegenden Erfindung für diesen zweiten Primer durchaus auch eine Sequenz gewählt werden, die nicht einer der Formeln Ia - Ih oder IIa - IIh entspricht.
- 20 Erfindungsgemäß wird zumindestens einer der Primer aus den Formeln Ia - Ih oder bevorzugt aus den Formeln IIa - IIh ausgewählt. Der zweite Primer beeinflusst, wie bereits erläutert, die Spezifität der Amplifikationsreaktion wesentlich weniger als der erste Primer. Bevorzugt werden jedoch Kombinationen, bei denen beide Primer aus
- 25 den Formeln Ia - Ih oder IIa - IIh ausgewählt werden. Beispiele für derartige bevorzugte Kombinationen sind (typische Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt):
- a) Bei Verwendung einer Kombination eines Primers nach Formel IIc mit einem Primer mit der Komplementärsequenz nach Formel IIb
- 30 wird nur die DNS von Listerien amplifiziert, nicht jedoch die DNS von anderen Bakterienarten (siehe Spalte D in Tabelle 1).
- b) Bei Verwendung einer Kombination eines Primers nach Formel IId mit einem Primer mit der Komplementärsequenz nach Formel IIb wird nur die DNS von *L. monocytogenes* amplifiziert, nicht

jedoch die DNS von anderen Listerien oder anderen Bakterien (siehe Spalte B in Tabelle 1).

- 5 c) Bei Verwendung einer Kombination eines Primers nach Formel II f mit einem Primer mit der Komplementärsequenz nach Formel II b wird nur die DNS von bestimmten Listerien-Arten amplifiziert, nämlich ausschließlich von *L. seeligeri*, *L. welshimiri* und *L. ivanovii*. Mithin ist ein gruppenspezifischer Nachweis möglich
10 (siehe Spalte E in Tabelle 1).
- d) Ein anderes Beispiel für einen gruppenspezifischen Nachweis besteht in der Verwendung einer Kombination eines Primers nach Formel II h mit einem Primer mit der Komplementärsequenz nach Formel II b: Es wird nur die DNS von *L. grayi* und *L. murrayi*
15 amplifiziert (siehe Spalte G in Tabelle 1).
- e) Da die Amplifikationsprodukte verschiedener Listerien-Arten unterschiedliche Molekulargewichte aufweisen, können durch eine Kombination von mehreren Primern (nach Formeln II d, II f, II g und II h) mit der Komplementärsequenz von Formel II b mit einer
20 einzigen Polymerasereaktion Bakterien der Gattung *Listeria* differenziert werden. Einzelheiten dieser Weiterentwicklung der Polymerasetechnik sind aus Beispiel 8 ersichtlich (siehe Spalte H in Tabelle 1, sowie Figur 1).
- 25 Wie bereits erwähnt, ist es auch möglich, die Amplifikationsprodukte durch Nukleinsäurehybridisierung nachzuweisen. Dazu werden dem Reaktionsansatz nach der Amplifikation geeignete Nukleinsäurestücke (Nukleinsäuresonden) zugesetzt. Diese Nukleinsäuresonden besitzen eine Basensequenz, die ganz oder teilweise komplementär zu
30 dem amplifizierten Genabschnitt ist. Diese Sonden sind außerdem für eine Nachweisreaktion markiert: Sie können radioaktive Isotope enthalten, oder Fluoreszenzmarkierungen tragen, oder auch durch Enzyme markiert sein. Geeignete Markierungsmittel, Methoden zu ihrer Einfügung in die Nukleinsäuresonde und Nachweismethoden sind
35 dem Fachmann bekannt.

Im besonderen kann die Amplifikationsreaktion spezifisch für die Gattung *Listeria* (wie oben unter a) näher beschrieben) oder für
5 eine Gruppe von *Listerien*-Arten (wie oben unter c) und d) beschrieben) ausgelegt sein. Durch Verwendung von Nukleinsäuresonden, die für jeweils eine Art spezifisch sind, kann dann im Reaktionsansatz, das Vorhandensein dieser Arten von *Listerien* erkannt werden. Wenn die Sonden verschiedene Markierungsmittel enthalten, können auch
10 verschiedene Arten nebeneinander nachgewiesen werden. Diese Verfahrensvariante erlaubt also ähnlich der unter e) oben beschriebenen den Nachweis verschiedener *Listerien*-Arten nebeneinander.

Die Verwendung einer Nukleinsäuresonde oder eines Gemisches
15 verschiedener Sonden, die mit Amplifikationsprodukten aller *Listerien*arten reagieren, erlaubt es, die Spezifität der Amplifikationsreaktion zu überprüfen oder ein einheitliches Nachweisreagenz für verschiedene *Listerien*-Arten bereitzustellen.

20 Die erfindungsgemäßen Peptide nach den Formeln IVa - IVe und nach Abbildung 2 a-i können in immunogene Konjugate eingebaut werden. Mit Hilfe dieser Konjugate können Antikörper erzeugt werden, die es ermöglichen, Bakterien der Gattung *Listeria* mit immunologischen Methoden spezifisch nachzuweisen.

25 Die Positionen der erfindungsgemäßen Peptide in der Gesamtsequenz des Proteins p60 aus *Listeria monocytogenes* sind im folgenden angegeben:

- 30 a) Die Sequenz nach Formel IIIa beginnt mit Prolin an Position 148 der p60 Sequenz (Fig. 4a); in dieser Region befinden sich auch die Peptide nach Fig. 2a, 2e und 2f.
- b) Die Sequenz nach Formel IIIb beginnt mit Threonin an Position 178 der p60 Sequenz (Fig. 4a); in dieser Region befinden sich auch die Peptide nach Fig. 2b und 2h.

- c) Die Sequenz nach Formel IIIc beginnt mit Alanin an Position 243 der p60 Sequenz (Fig. 4a); in dieser Region befinden sich auch die Peptide nach Fig. 2c und 2i.
- d) Die Sequenz nach Formel III d beginnt mit Glutamin an Position 292 der p60 Sequenz (Fig. 4b); in dieser Region befindet sich auch das Peptid nach Fig. 2d.
- e) Die Sequenz nach Formel III e beginnt mit Valin an Position 71 der p60 Sequenz (Fig. 4a); in dieser Region befindet sich auch das Peptid nach Fig. 2g.

Dem Fachmann ist bekannt, daß häufig der Austausch von einer oder wenigen Aminosäuren in einem Peptid dessen biologische Eigenschaften nicht verändert. Deswegen umfassen die erfindungsgemäßen Peptidsequenzen auch solche, die durch Aminosäureaustausch aus den Sequenzen nach Fig. 2 a-i oder nach Fig. 3 abgeleitet sind, und die biologisch dieselbe Wirkung wie die jeweiligen Peptide mit der Ursprungssequenz zeigen.

Die Auswahl der erfindungsgemäßen Peptide erwies sich als kritisch. Wählt man beispielsweise ein bestimmtes Peptid, das von dem für L. monocytogenes spezifischen Genabschnitt kodiert wird, für die Erzeugung von Antikörpern aus, so zeigt überraschenderweise keines der Antiseren eine Reaktion mit dem p60-Protein.

Basierend auf der Sequenz der Aminosäuren können die Peptide nach dem Fachmann bekannten Verfahren, beispielsweise dem t_{Boc} - oder dem f_{moc} -Verfahren (tert.butyloxycarbonyl-, bzw. 9-fluorenylmethyloxycarbonyl-), synthetisiert werden. Einzelheiten dieser Verfahren sind beispielsweise in J.Am.Chem.Soc. 85, 2149-2154 (1963) und in Synthetic Polypeptides as Antigens (van Regenmortel et al. (eds.) Elsevier 1988 (Band 19 der Buchreihe Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology) beschrieben. Bevorzugt wird das f_{moc} -Verfahren, insbesondere mechanisierte Verfahrensvarianten.

Einzelheiten des Verfahrens, sowie geeignete Aminosäureschutzgruppen sind dem Fachmann bekannt.

5

Peptide sind im allgemeinen nicht geeignet, Antikörper zu erzeugen. Werden Peptide jedoch an hochmolekulare Trägersubstanzen gekoppelt, so entstehen immunogene Konjugate. Die erfindungsgemäßen Peptide lassen sich mit bekannten Trägersubstanzen konjugieren. Dazu gehören Polyäthylenglykole, Serumalbumine, KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin; Hämocyanin von Napfschnecken), Ovalbumin, Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium* und PPD (purified protein derivative of tuberculin). Bevorzugte Trägersubstanzen sind KLH und Glucosedehydrogenase aus *B. megaterium*.

15

Außerdem werden zusätzlich häufig Brückenverbindungen (linker) eingesetzt. Dies sind niedermolekulare organische Verbindungen mit mindestens zwei verknüpfbaren funktionellen Gruppen. Geeignete Verbindungen sind dem Fachmann bekannt; dazu gehören beispielsweise: 1,2-Diaminoethan, Bernsteinsäure, β -Alanin, 1,6-Diaminohexan, 6-Aminocapronsäure, Adipinsäure, Cystein. Cystein ist als Linker bevorzugt. Bevorzugt wird Cystein als Linker eingesetzt, wobei dieser Aminosäurerest bereits bei der Synthese des Peptides eingebaut wird. Linker, die sowohl eine Amino- als auch eine Carboxylfunktion enthalten (z.B. β -Alanin, 6-Aminocapronsäure oder Cystein), können wahlweise am C- oder N-Terminus des Peptids angeknüpft werden. Zur Herstellung der Bindungen zwischen Peptid und Trägersubstanz werden bevorzugt m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester (MBS) eingesetzt.

30

Die genannten immunogenen Konjugate dienen dazu, nach bekannten Verfahren in Versuchstieren Antikörper zu erzeugen. Üblicherweise werden für diesen Zweck Säugetiere, beispielsweise Schaf, Ziege, Kaninchen oder Mäuse benutzt. Kaninchen sind für die Erzeugung polyklonaler Antikörper bevorzugt. Es ist aber auch möglich, mit

35

Hilfe der erfindungsgemäßen immunogenen Konjugate monoklonale Antikörper herzustellen.

5

Einzelheiten der immunologischen Verfahren sind dem Fachmann bekannt. Hinweise zur Durchführung dieser Verfahren sind außerdem vielfältig in der Literatur anzutreffen; beispielsweise seien genannt:

- 10 * Antibodies, E. Harlow und D. Lane, Cold Spring Harbor (1988)
 * Woodard, L.F. und Jasman, R.L. (1985) Vaccine 3, 137-144
 * Woodard, L.F. (1989) Laboratory Animal Sci 39, 222-225
 * Handbook of Experimental Immunology (1986) Weir, D.M. et al.
 eds.; Blackwell Scientific Publications, Oxford, GB
- 15 Zu diesen Verfahren gehören beispielsweise die Konjugations- und
 Immunisierungsverfahren, sowie die Herstellung und Aufreinigung von
 Antikörpern und auch immunologische Nachweisverfahren. Zu den
 immunologischen Nachweisverfahren, bei denen erfindungsgemäße
 Antikörper benutzt werden können, gehören bevorzugt Agglutinations-
20 verfahren, immunometrische Nachweisverfahren, die Immuno-Blot-
 Verfahren und insbesondere die sandwich-(ELISA)-Verfahren.

Der Begriff Antikörper umfaßt erfindungsgemäß sowohl Immunglobuline
als auch Antiseren. Es ist dem Fachmann weiterhin bekannt, daß

25 häufig statt eines einzigen Antikörpers, der gegen ein einzelnes
 Epitop gerichtet ist, eine Mischung von verschiedenen Antikörpern
 mit verschiedener Spezifität benutzt werden kann. Dadurch
 resultieren Vorteile, insbesondere bezüglich der Nachweis-
 empfindlichkeit. Dies trifft im besonderen für monoklonale

30 Antikörper, aber auch für andere Antikörper zu, die gegen jeweils
 ein Epitop gerichtet sind. Entsprechend kann es vorteilhaft sein,
 mehrere Antikörper, die gegen verschiedene Peptidstrukturen nach
 den Formeln IIIa - IIIe oder nach einer der Abbildungen 3 oder 2 a-
 i gerichtet sind, für die erfindungsgemäße Verwendung und/oder die

35 erfindungsgemäßen Verfahren zu kombinieren.

Einzelheiten der Herstellung der erfindungsgemäßen Primer und Peptide, sowie ihrer Verwendung sind aus den folgenden Beispielen
5 ersichtlich. Weitere methodische Einzelheiten entnimmt der Fachmann der zitierten Literatur. Die Beispiele sollen den Gegenstand der Erfindung illustrieren und stellen keine Einschränkung der Erfindung dar.

10 Beispiele:

Beispiel 1: Herstellung des Primers nach Formel IIa

15 Der Primer nach Formel IIa wird mit dem DNA-Synthesizer 380A von Applied Biosystems nach der Phosphoramidit-methode hergestellt. Die Grundzüge der Methode ist in Tetrahedron Lett. (1981) 22 : 1859-1862, beschrieben. Weitere Einzelheiten finden sich in der Dokumentation des Geräteherstellers.

20 Entsprechend werden die Primer nach Formel IIc, IId, IIe, IIg und IIh hergestellt. Die Primer nach Formel IIb und IIe werden in der jeweiligen Komplementärsequenz (IIb: TTGGCTTCGGTCGCGTAGAATTCATA; IIe: GCACTTGAATTGCTGTTATTG) hergestellt.

25 Beispiel 2: Durchführung der PCR-Reaktion zum artspezifischen Nachweis von L. monocytogenes

30 Eine bakterienhaltige Probe mit ca. 1 µg DNA wird in 50 µl Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl und 50 mM KCl) suspendiert und 5 Minuten auf 110 °C erhitzt. Anschließend werden Primer nach Formel IId und IIe (siehe Beispiel 1; je 0,4 µg), sowie 2,5 U Taq-Polymerase (Fa. Pharmacia), gelöst in Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl und 50 mM KCl), sowie jeweils 200 µM dGTP,
35

dATP, dTTP und dCTP zugefügt (gesamtes Reaktionsvolumen 100 μ l).
Der erste Denaturierungsschritt dauert 3 Minuten bei 94 °C.

- 5 Anschließend wird für 30 Sekunden auf 55 °C (Bindungsphase) und für eine Minute auf 72 °C (Elongationsphase) temperiert. Die folgenden Denaturierungsschritte (bei 94 °C) dauern 45 Sekunden. Nach 30 Reaktionszyklen wird ein abschließender Elongationsschritt (bei 72 °C) mit 5 Minuten Dauer ausgeführt.

10

Die PCR-Produkte werden in einem Polyacrylamid-Gel (6%) in einem Laufpuffer Tris-Borat (je 50 mM) mit EDTA (2,5 mM) aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennte PCR-Produkte durch Anfärbung mit Ethidiumbromid (0,1 mg/ml in Wasser) angefärbt und Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht.

15

Nur wenn DNA oder Zellen von *L. monocytogenes* in der Probe vorhanden sind, werden PCR-Produkte beobachtet (siehe Spalte A in Tabelle 1).

20

Beispiel 3: Durchführung der PCR-Reaktion zum artspezifischen Nachweis von *L. monocytogenes*

25

Das in Beispiel 2 beschriebene Verfahren wird unter Verwendung der Primer nach Formel II d und II b (siehe Beispiel 1) anstelle der Primer nach Formel II d und II e wiederholt. Auch in diesem Fall werden nur PCR-Produkte beobachtet, wenn DNA oder Zellen von *L. monocytogenes* in der Probe vorhanden sind (siehe Spalte B in Tabelle 1).

30

35

Beispiel 4: Durchführung der PCR-Reaktion zum genusspezifischen Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria

5

Eine bakterienhaltige Probe mit ca. 1 μg DNA wird in 50 μl Wasser suspendiert und 5 Minuten auf 110 $^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Anschließend werden Primer nach Formel IIc und IIb (siehe Beispiel 1; je 0,4 μg), sowie 2,5 U Taq-Polymerase (Fa. Pharmacia), gelöst in Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl und 50 mM KCl), sowie jeweils 200 μM dGTP, dATP, dTTP und dCTP zugefügt (gesamtes Reaktionsvolumen 100 μl). Der erste Denaturierungsschritt dauert 3 Minuten bei 94 $^{\circ}\text{C}$. Anschließend wird für 30 Sekunden auf 56 $^{\circ}\text{C}$ (Bindungsphase) und für zwei Minuten auf 72 $^{\circ}\text{C}$ (Elongationsphase) temperiert. Die folgenden Denaturierungsschritte (bei 94 $^{\circ}\text{C}$) dauern 45 Sekunden. Nach 30 Reaktionszyklen wird ein abschließender Elongationsschritt (bei 72 $^{\circ}\text{C}$) mit 5 Minuten Dauer ausgeführt.

Die PCR-Produkte werden in einem Agarose-Gel (1 %) in einem Laufpuffer Tris-Borat (je 50 mM) mit EDTA (2,5 mM) aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennte PCR-Produkte durch Anfärbung mit Ethidiumbromid (0,1 mg/ml in Wasser) angefärbt und Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht.

In diesem Fall werden PCR-Produkte beobachtet, wenn DNA oder Zellen von Bakterien der Gattung Listeria in der Probe vorhanden sind (siehe Spalte D in Tabelle 1).

Beispiel 5: Durchführung der PCR-Reaktion zum gruppenspezifischen Nachweis von Listerien

Eine bakterienhaltige Probe mit ca. 1 μg DNA wird in 50 μl Wasser suspendiert und 5 Minuten auf 110 $^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Anschließend werden Primer nach Formel IIc und IIb (siehe Beispiel 1; je 0,4 μg), sowie

2,5 U Taq-Polymerase (Fa. Pharmacia), gelöst in Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl und 50 mM KCl), sowie jeweils 200 μ M dGTP, dATP, dTTP und dCTP zugefügt (gesamtes Reaktionsvolumen 100 μ l). Der erste Denaturierungsschritt dauert 3 Minuten bei 94 °C. Anschließend wird für 45 Sekunden auf 58 °C (Bindungsphase) und für eine Minute auf 72 °C (Elongationsphase) temperiert. Die folgenden Denaturierungsschritte (bei 94 °C) dauern 45 Sekunden.

10 Nach 30 Reaktionszyklen wird ein abschließender Elongationsschritt (bei 72 °C) mit 5 Minuten Dauer ausgeführt.

Die PCR-Produkte werden in einem Agarose-Gel (1%) in einem Laufpuffer Tris-Borat (je 50 mM) mit EDTA (2,5 mM) aufgetrennt.

15 Anschließend werden die aufgetrennte PCR-Produkte durch Anfärbung mit Ethidiumbromid (0,1 mg/ml in Wasser) angefärbt und Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht.

In diesem Fall werden nur PCR-Produkte beobachtet, wenn DNA oder Zellen von Bakterien aus der Gruppe *L. ivanovii*, *L. seeligeri* und *L. welshimeri* in der Probe vorhanden sind (siehe Spalte E in Tabelle 1).

20

25 Beispiel 6: Durchführung der PCR-Reaktion zum artspezifischen Nachweis von *L. innocua*

Eine bakterienhaltige Probe mit ca. 1 μ g DNA wird in 50 μ l Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl und 50 mM KCl) suspendiert und 5 Minuten auf 110 °C erhitzt. Anschließend werden Primer nach Formel IIg und IIb (siehe Beispiel 1; je 0,4 μ g), sowie 2,5 U Taq-Polymerase (Fa. Pharmacia), gelöst in Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl und 50 mM KCl), sowie jeweils 200 μ M dGTP, dATP, dTTP und dCTP zugefügt (gesamtes Reaktionsvolumen 100 μ l).

30

35 Der erste Denaturierungsschritt dauert 3 Minuten bei 94 °C.

Anschließend wird für 60 Sekunden auf 62 °C (Bindungsphase) und für 45 Sekunden auf 72 °C (Elongationsphase) temperiert. Die folgenden
5 Denaturierungsschritte (bei 94 °C) dauern 45 Sekunden. Nach 30 Reaktionszyklen wird ein abschließender Elongationsschritt (bei 72 °C) mit 5 Minuten Dauer ausgeführt.

Die PCR-Produkte werden in einem Agarose-Gel (1 %) in einem
10 Laufpuffer Tris-Borat (je 50 mM) mit EDTA (2,5 mM) aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennte PCR-Produkte durch Anfärbung mit Ethidiumbromid (0,1 mg/ml in Wasser) angefärbt und Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht.

15 Nur wenn DNA oder Zellen von *L. innocua* in der Probe vorhanden sind, werden PCR-Produkte beobachtet (siehe Spalte C in Tabelle 1).

Beispiel 7: Durchführung der PCR-Reaktion zum gruppenspezifischen
20 Nachweis von Listerien

Eine bakterienhaltige Probe mit ca. 1 µg DNA wird in 50 µl Wasser suspendiert und 5 Minuten auf 110 °C erhitzt. Anschließend werden
25 Primer nach Formel IIh und IIb (siehe Beispiel 1; je 0,4 µg), sowie 2,5 U Taq-Polymerase (Fa. Pharmacia), gelöst in Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl und 50 mM KCl), sowie jeweils 200 µM dGTP, dATP, dTTP und dCTP zugefügt (gesamtes Reaktionsvolumen 100 µl). Der erste Denaturierungsschritt dauert 3 Minuten bei 94 °C. Anschließend wird für 45 Sekunden auf 56 °C (Bindungsphase)
30 und für 45 Sekunden auf 72 °C (Elongationsphase) temperiert. Die folgenden Denaturierungsschritte (bei 94 °C) dauern 45 Sekunden. Nach 30 Reaktionszyklen wird ein abschließender Elongationsschritt (bei 72 °C) mit 5 Minuten Dauer ausgeführt.

Die PCR-Produkte werden in einem Agarose-Gel (1 %) in einem Laufpuffer Tris-Borat (je 50 mM) mit EDTA (2,5 mM) aufgetrennt.

- 5 Anschließend werden die aufgetrennte PCR-Produkte durch Anfärbung mit Ethidiumbromid (0,1 mg/ml in Wasser) angefärbt und Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht.

- 10 In diesem Fall werden nur PCR-Produkte beobachtet, wenn DNA oder Zellen von Bakterien aus der Gruppe *L. grayi* und *L. murrayi* in der Probe vorhanden sind (siehe Spalte G in Tabelle 1).

- Beispiel 8: Durchführung einer kombinierten PCR-Reaktion zum
15 artspezifischen Nachweis von *L. monocytogenes* und von *L. innocua* und zum gruppenspezifischen Nachweis der Gruppen *L. ivanovii* / *L. seeligeri* / *L. welshimeri* und *L. grayi* / *L. murrayi*

- 20 Eine bakterienhaltige Probe mit ca. 1 µg DNA wird in 50 µl Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl und 50 mM KCl) suspendiert und 5 Minuten auf 110 °C erhitzt. Anschließend wird eine Mischung von Primern nach Formel IId, II f, II g, II h, sowie II b (siehe Beispiel 1; je 0,4 µg), sowie 2,5 U Taq-Polymerase (Fa. Pharmacia), gelöst in Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl und 50 mM
25 KCl), sowie jeweils 200 µM dGTP, dATP, dTTP und dCTP zugefügt (gesamtes Reaktionsvolumen 100 µl). Der erste Denaturierungsschritt dauert 3 Minuten bei 94 °C. Anschließend wird für 45 Sekunden auf 56 °C (Bindungsphase) und für eine Minute auf 72 °C (Elongationsphase) temperiert. Die folgenden Denaturierungsschritte
30 (bei 94 °C) dauern 45 Sekunden. Nach 30 Reaktionszyklen wird ein abschließender Elongationsschritt (bei 72 °C) mit 5 Minuten Dauer ausgeführt.

- 35 Die PCR-Produkte werden in einem Polyacrylamid-Gel (4 %) in einem Laufpuffer Tris-Borat (je 50 mM) mit EDTA (2,5 mM) aufgetrennt.

Zusätzlich wird eine Nukleinsäuremischung (beispielsweise das Produkt aus der Spaltung von Spp1 Phagen DNA mittels

- 5 Restriktionsendonuklease EcoRI) als Molekulargewichtsstandard mitgeführt. Anschließend werden die aufgetrennte PCR-Produkte durch Anfärbung mit Ethidiumbromid (0,1 mg/ml in Wasser) angefärbt und Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht.
- 10 Das Vorhandensein von DNA oder Zellen von Bakterien aus der Art *L. monocytogenes*, der Art *L. innocua*, der Gruppe *L. ivanovii* / *L. seeligeri* / *L. welshimeri* oder der Gruppe *L. grayi* / *L. murrayi* kann auf Grund der unterschiedlichen Molekulargewichte differenziert werden (siehe Spalte H in Tabelle 1, sowie Figur 1).

15

Beispiel 9: Synthese des Peptides

CysGlnGlnGlnThrAlaProLysAlaProThrGlu

- 20 Für die Synthese des Peptides CysGlnGlnGlnThrAlaProLysAlaProThrGlu wird das f_{moc} -Verfahren (9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-Schutzgruppe) benutzt. Dieses Peptid entspricht einem Peptid der Formel IVd mit einem zusätzlichen N-terminalen Cysteinrest als Linker. Für die Synthese wird ein Peptid-Synthetizer der Fa. Applied Biosystems
- 25 benutzt, die Prozessparameter sind in der Gerätedokumentation enthalten.

- Ein polymerer Träger mit 4-(2',4'-Dimethoxyphenylaminomethyl)-phenoxygruppen dient als Festphase. Die Aminosäuren werden als α -N- f_{moc} -Derivate eingesetzt. Soweit die Aminosäuren reaktive Seiten-
- 30 gruppen enthalten, werden diese durch zusätzliche Schutzgruppen, die durch Trifluoressigsäurehydrolyse abspaltbar sind, maskiert. Die Peptidbindungen werden durch Aktivierung der Carboxylgruppen mittels Diisopropylcarbodiimid hergestellt. Die Reihenfolge der

35

eingesetzten Aminosäurederivate ergibt sich aus der gewünschten Sequenz.

5 Im ersten Schritt des Synthesesyklus reagiert die Aminogruppe an der Festphase, d.h. im ersten Zyklus die Aminogruppen des 4-(2',4'-Dimethoxyphenylaminomethyl)-phenoxyrests des Trägers, in den folgenden Zyklen die α -Aminogruppe der zuletzt angefügten
10 Aminosäure, mit den Carboxylgruppe der nächsten Aminosäure, die als α -N-fmoc-Derivat, gegebenenfalls mit geschützten Seitenketten eingesetzt wird, und die durch Diisopropylcarbodiimid aktiviert wird. Nicht umgesetzte Aminosäurederivate werden mit Dimethylformamid ausgewaschen. Anschließend wird die fmoc-Gruppe durch
15 Behandeln mit 20 % (V/V) Piperidin in Dimethylformamid abgespalten. Die übrigen Schutzgruppen bleiben bei dieser Reaktion unverändert. Mit der Entfernung der α -N-Schutzgruppe kann der nächste Reaktionszyklus beginnen. Nachdem die letzte Aminosäure entsprechend der vorgesehenen Sequenz zugefügt worden ist, werden die Schutzgruppen
20 der Seitenketten und die Bindung zum Trägerharz durch saure Hydrolyse mittels Trifluoressigsäure gespalten. Das Peptid wird anschließend durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie gereinigt.

Entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise werden auch die
25 übrigen Peptide mit den erfindungsgemäßen Sequenzen synthetisiert.

Beispiel 10: Konjugation des Peptides

CysGlnGlnGlnThrAlaProLysAlaProThrGlu mit Glucosedehydrogenase

30 a) Derivatisierung der Glucosedehydrogenase: 30 mg
Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megatherium* Fa. Merck, Art.Nr. 13732) werden in 4 ml Natriumphosphatpuffer (50 mM; pH 8,0) gelöst. Zu 2,4 ml dieser Lösung werden 6,78 mg N-y-Maleimidobutyryl-
35 oxysuccinimid (Fa. Calbiochem) gelöst in 50 μ l Dimethylsulfoxid

zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.
Anschließend wird das überschüssige N-y-Maleimidobutyryloxy-
5 succinimid durch Gelfiltration an PD-10 (Fa. Pharmacia)
chromatographisch abgetrennt. Nach der Chromatographie erhält man
3,5 ml Lösung des aktivierten Trägerproteins mit einer
Konzentration von 4,5 mg/ml.

- 10 b) Kopplung mit dem Peptid: Zu 1,1 ml der Lösung aus dem obigen
Schritt werden 5,2 mg des Peptides, hergestellt nach Beispiel 9,
gelöst in 1 ml Natriumphosphatpuffer (50 mM; pH 7,0) zugefügt und 3
Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird das
nicht gebundene Peptid durch Gelfiltration an PD-10 (Fa. Pharmacia)
15 chromatographisch abgetrennt. Nach der Chromatographie erhält man
3,5 ml Lösung des Konjugates mit einer Konzentration von 2,3 mg/ml.

Entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise werden auch
Konjugate mit den anderen Peptiden entsprechend der vorliegenden
20 Erfindung hergestellt.

Beispiel 11: Erzeugung von polyklonalen Antikörpern gegen das
Peptid CysGlnGlnGlnThrAlaProLysAlaProThrGlu

- 25 Zwei Kaninchen werden jeweils mit einer Emulsion aus 0,18 ml
Konjugat aus Beispiel 10, 0,07 ml-phosphatgepufferter Saline und
0,25 ml Ölajuvans (MISA 50, Fa. Seppic, FR) i.m. injiziert. Drei,
fünf und sieben Wochen nach der Erstinjektion erfolgen
30 Boosterinjektionen mit gleicher Menge. Eine Woche nach der letzten
Injektion werden die Tiere getötet und ausgeblutet. Nachdem das
Blut geronnen ist, wird das Antiserum durch Zentrifugation gewonnen
und Natriumazid bis zu einer Endkonzentration von 0,02 % zugefügt.
Das Antiserum wird bei -20 °C eingefroren gelagert.

Beispiel 12: Erzeugung von monoklonalen Antikörpern gegen das Peptid CysGlnGlnGlnThrAlaProLysAlaProThrGlu.

5 Zwei Mäuse werden jeweils mit einer Emulsion aus 0,1 ml Konjugat aus Beispiel 10 und 0,1 ml Öladjuvans (MISA 50, Fa. Seppic, FR) s.c. injiziert. Zwei, vier und sechs Wochen nach der Erstinjektion erfolgen Boosterinjektionen mit gleicher Menge. Drei Tage nach der
10 letzten Injektion werden die Tiere getötet und die Milz isoliert. Die Zellen aus der Milz werden nach üblichen Verfahren isoliert und mit einer permanenten murinen Zelllinie fusioniert. Aus den Fusionsprodukten werden Zelllinien selektioniert, die Antikörper gegen das Peptid CysGlnGlnGlnThrAlaProLysAlaProThrGlu bilden.

15

Beispiel 13: Immunologischer Nachweis von L. monocytogenes

a) Vorkultur und Zentrifugation der Bakterien: 10 ml CASO-Bouillon
20 werden mit Material aus mehreren Kolonien von L. monocytogenes angeimpft und bei 30°C über Nacht inkubiert. Anschließend wird je 1 ml der Kultur entnommen. Die Bakterienzellen werden abzentrifugiert (13000 UpM).

25 b) Identifizierungsreaktion: Je 300 µl der Überstände aus dem vorigen Arbeitsschritt werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wird je dreimal mit je 100 µl Waschlösung (9 g/l NaCl und 0,05% Tween 20 in Wasser) gewaschen. In die Vertiefungen werden
30 nun je 100 µl Antiserum hergestellt nach Beispiel 11 pipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es wird erneut je dreimal mit je 100 µl Waschlösung gewaschen. Dann werden in jede Vertiefung je 100 µl mit alkalischer Phosphatase markierter anti-kaninchen Antikörperlösung (Art.Nr. A 8025; Fa. Sigma) pipettiert und 30
35 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Vertiefungen werden

erneut mit je 100 μ l Waschlösung gewaschen und anschließend der gebundene enzymmarkierte Antikörper nachgewiesen. Dazu werden 200 μ l einer Pufferlösung mit Substrat eingefüllt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von je 100 μ l 2 N NaOH-Lösung (Art.Nr. 9136, Fa. Merck) abgestoppt und das Reaktionsprodukt sichtbar gemacht. Eine gelborange Färbung zeigt die Anwesenheit von *L. monocytogenes* an.

10

Beispiel 14: Spezifischer Nachweis von *L. monocytogenes* mittels Immunoblot

15 Bakterien werden wie in Beispiel 13a) beschrieben vorkultiviert und die Zellen abzentrifugiert. Die abzentrifugierten Zellen werden in 1 ml phosphatgepufferter Saline aufgenommen und suspendiert. 2 μ l dieser Suspension werden auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond C, 0,45 μ m, Art.Nr. RPN 283 C, Fa. Amersham) pipettiert. Nachdem die Lösung eingetrocknet ist, wird die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer Lösung von Rinderserumalbumin (10 g/l) in phosphatgepufferter Saline behandelt. Es wird eine Verdünnung (1:200) des in Beispiel 11 erhaltenen Antiserums mit einer Lösung von Rinderserumalbumin (10 g/l) und Tween 20 (0,5 g/l) in phosphatgepufferter Saline (Antikörperlösung A), sowie eine weitere Verdünnung (1:500) von peroxidasemarkiertem anti-Kaninchen Antikörper (anti Rabbit IgG, Art.Nr. 68-397; Fa. ICN Immuno Biologicals) mit demselben Verdünnungsmittel (HRP-Antikörperlösung) vorbereitet. Die Membran wird eine Stunde bei Raumtemperatur mit Antikörperlösung A inkubiert und anschließend dreimal mit phosphatgepufferter Saline mit 0,05% Tween 20 gewaschen. Um die Antikörperbindung nachzuweisen, wird die Membran anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur mit HRP-Antikörperlösung inkubiert und je dreimal mit a) Tween 20 (0.5 g/l) in phosphatgepufferter Saline, b) mit phosphatgepufferter Saline und c) mit TRIS-Puffer (50 mM; pH

20
25
30
35

7,4; mit 200 mM NaCl) gewaschen. Für die Farbreaktion wird eine
Lösung von 4-Chloro-1-naphthol (3 mg/ml in Methanol) mit fünf
5 Volumen TRIS-Puffer (50 mM; pH 7,4; mit 200 mM NaCl) verdünnt und
Wasserstoffperoxid zugesetzt (Endkonzentration 0,1 g/l). Die
Membran wird in dieser Substratlösung inkubiert. Eine blauschwarze
Färbung zeigt L. monocytogenes an.

10

15

20

25

30

35

Tabelle 1: Spezifität der Polymerase-Ketten-Reaktion bei Verwendung verschiedener Primer entsprechend Formel IIa - IIIh

Kombination:	A	B	C	D	E	F	G	H
Primer 1:	IIId	IIId	IIg	IIc	IIIf	IIa	IIh	M ³⁾
Primer 2:1)	IIe	IIb	IIb	IIb	IIb	IIb	IIb	IIb
untersuchte Reaktion								
Bakterien:								
L. monocytogenes								
Serovar 1/2a EGD	+	+	-	+	-	+	-	+
Serovar 1/2a Mack.2)	+	+	-	+	-	+	-	+
Serovar 1/2b	+	+	-	+	-	+	-	+
Serovar 1/2c	+	+	-	+	-	+	-	+
Serovar 3a	+	+	-	+	-	+	-	+
Serovar 3b	+	+	-	+	-	+	-	+
Serovar 3c	+	+	-	+	-	+	-	+
Serovar 4a	+	+	-	+	-	+	-	+
Serovar 4ab	+	+	-	+	-	+	-	+
Serovar 4b	+	+	-	+	-	+	-	+
Serovar 4c	+	+	-	+	-	+	-	+
Serovar 4d	+	+	-	+	-	+	-	+
Serovar 4e	+	+	-	+	-	+	-	+
Serovar 7	+	+	-	+	-	+	-	+
L. ivanovii	-	-	-	+	+	+	-	+
L. seeligeri	-	-	-	+	+	+	-	+
L. innocua								
Serovar 6a	-	-	+	+	-	+	-	+
Serovar 6b	-	-	+	+	-	+	-	+
Serovar 4ab	-	-	+	+	-	+	-	+
L. welshimeri	-	-	-	+	+	+	-	+
L. murrayi	-	-	-	+	-	+	+	+
L. grayi	-	-	-	+	-	+	+	+
Enterococcus faecalis	-	-	-	-	-	+	-	-
Bacillus cereus	-	-	-	-	-	+	-	-
Micrococcus flavus	-	-	-	-	-	+	-	-

Legende:

- + PCR-Produkt nachgewiesen
- kein PCR-Produkt nachweisbar
- 1) komplementäre Sequenz
- 2) Mack.: Stamm Mackaness
- 3) M: Mischung aus Primern nach Formel IIId, IIIf, IIg und IIh; Amplifikationsprodukte können auf Grund des Molekulargewichtes differenziert werden.

Ansprüche

- 5 1. Primer, ausgewählt aus dem iap-Gen (invasion associated protein), für die Amplifikation von Nukleinsäuren, gekennzeichnet durch eine Sequenz nach einer der Formeln Va bis Vh und/oder einer zugehörigen Komplementärsequenz, worin
- 10 X^1 und X^2 jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff, ein beliebiges Nukleotid oder ein beliebiges Oligonukleotid mit bis zu 20 Nukleotidbausteinen bedeuten.

15	$X^1AATATGAAAAAAGCX^2$	Va
	$X^1GCTTCGGTCGCGTAX^2$	Vb
	$X^1ACAGCTGGGATTG CX^2$	Vc
	$X^1ACTGCTAACACAGCTX^2$	Vd
	$X^1TAACAGCAATTCAAGX^2$	Ve
20	$X^1CTGAGGTAGCGAGCX^2$	Vf
	$X^1AGCACTCCAGTTGTTAX^2$	Vg
	$X^1GCAGTTTCTAAACCTX^2$	Vh

- 25 2. Primer, gekennzeichnet durch eine Sequenz nach einer der Formeln IIa bis IIh.

	ATGAATATGAAAAAAGCAAC	IIa
	TTGGCTTCGGTCGCGTATAA	IIb
	GCTACAGCTGGGATTGCGGT	IIc
30	CAAAC TGCTAACACAGCTACT	IId
	CAATAACAGCAATTCAAGTGC	IIe
	TAACTGAGGTAGCGAGCGAA	IIf
	ACTAGCACTCCAGTTGTTAAAC	IIg
35	CCAGCAGTTTCTAAACCTGCT	IIh

3. Peptid, ausgewählt aus dem Protein p60, gekennzeichnet durch eine Sequenz nach einer der Formeln IVa bis IVe,

5	X ³ ProValAlaProThrGlnX ⁴	IVa
	X ³ ThrGlnAlaThrThrProAlaX ⁴	IVb
	X ³ AlaIleLysGlnThrAlaAsnThrAlaX ⁴	IVc
	X ³ GlnGlnThrAlaProLysAlaProThrX ⁴	IVd
10	X ³ ValAsnAsnGluValAlaAlaAlaGluLysThrGluX ⁴	IVe

worin

X³ und X⁴ jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff, eine beliebige Aminosäure oder ein beliebiges Oligopeptid mit bis zu

15 7 Aminosäuren

bedeuten.

4. Peptid nach Anspruch 3, gekennzeichnet durch eine der in Fig. 2 a-i dargestellten Sequenzen.

20

5. Verwendung eines Peptides nach einem der Ansprüche 3 - 4 zur Herstellung von immunogenen Konjugaten.

6. Antikörper gerichtet gegen das Protein p60 aus Listerien, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Epitop aus der Sequenz des Polypeptids nach Figur 3 bindet.

25

7. Antikörper nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Epitop bindet, welches eine der in Fig. 2 a-i dargestellten Sequenzen enthält.

30

8. Antikörper, herstellbar durch Immunisierung eines Versuchstieres mit einem Polypeptid nach Figur 3 oder mit einem immunogenen Konjugat, welches ein Peptid mit 7 bis 24 Aminosäuren ausgewählt aus dem Polypeptid nach Fig. 3 enthält.

9. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers gerichtet gegen das Protein p60 aus Listerien, indem man ein Versuchstier mit einem Immunogen immunisiert und den Antikörper isoliert, dadurch gekennzeichnet, daß man als Immunogen ein Polypeptid nach Fig. 3 oder ein immunogenes Konjugat, das ein Polypeptid nach Fig. 3 enthält, verwendet.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als Immunogen ein immunogenes Konjugat verwendet, das ein Peptid mit 7 bis 24 Aminosäuren ausgewählt aus dem Polypeptid nach Fig. 2 enthält.

11. Verfahren nach dem Oberbegriff des Anspruches 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als Immunogen ein immunogenes Konjugat verwendet, das ein Peptid nach einer der Formeln IVa-IVe aus Anspruch 3 enthält.

12. Verwendung eines Primers nach einem der Ansprüche 1 - 2 für den Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria.

13. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria mittels Genamplifikation, dadurch gekennzeichnet, daß ein Primer nach einem der Ansprüche 1 - 2 verwendet wird.

14. Verwendung eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 6-8 für den Nachweis von Bakterien der Gattung *Listeria*.

5

15. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Listeria* mittels einer Immunreaktion, dadurch gekennzeichnet, daß ein Antikörper nach einem der Ansprüche 6-8 verwendet wird.

10 16. Testzusammenstellung zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Listeria* mittels Polymerase-Ketten-Reaktion, dadurch gekennzeichnet, daß darin ein Primer nach einem der Ansprüche 1 - 2 enthalten ist.

15 17. Testzusammenstellung nach Anspruch 16 zum Nachweis von Bakterien der Art *Listeria monocytogenes*.

18. Testzusammenstellung zum Nachweis von Bakterien der Art *Listeria monocytogenes* mittels Immunoassay, dadurch gekennzeichnet,
20 daß darin ein Antikörper nach einem der Ansprüche 6-8 enthalten ist.

25

30

35

Fig. 1

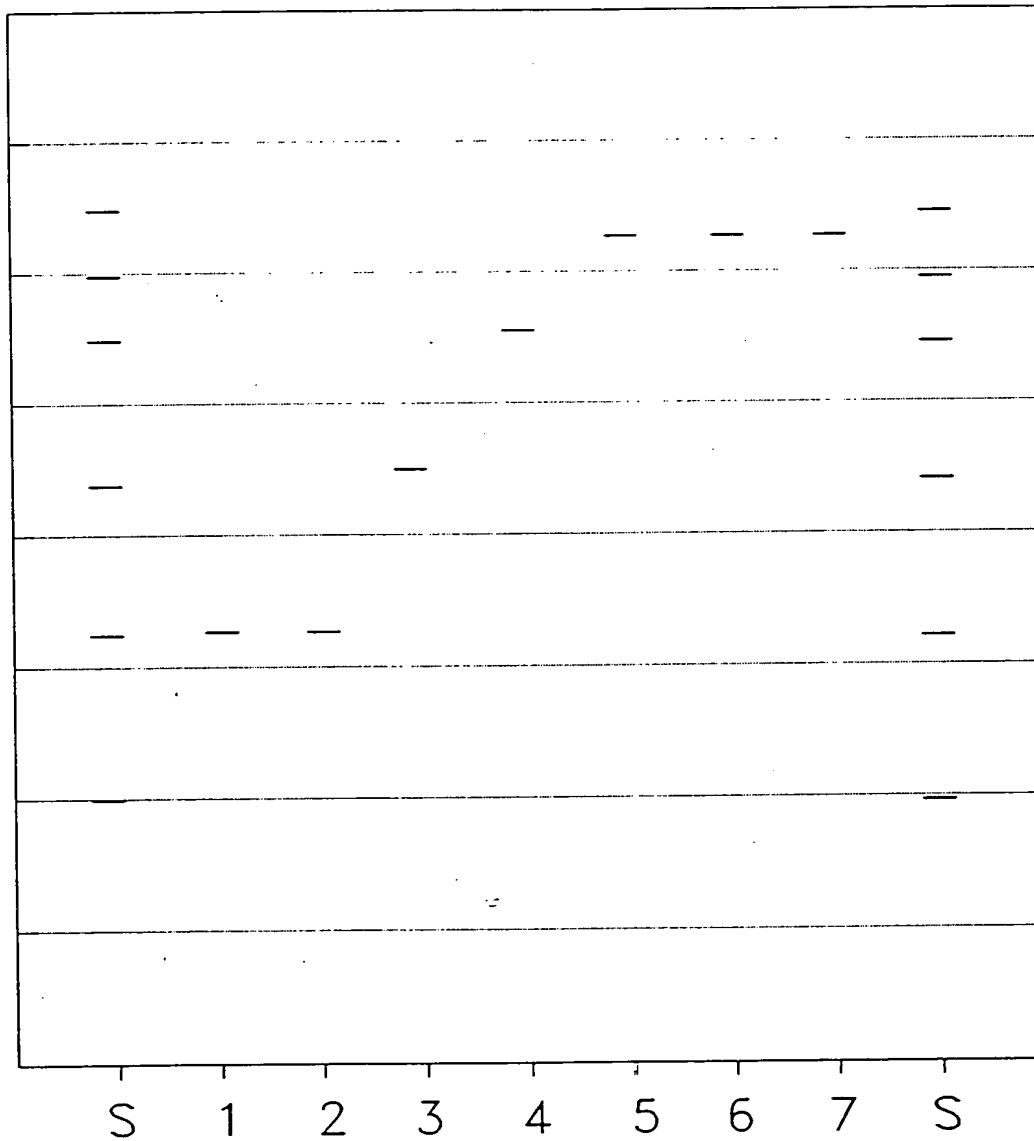


Fig. 2

a:

Val Ser Thr Pro Val Ala Pro Thr Gln
1 5

b:

Thr Thr Gln Ala Thr Thr Pro Ala Pro Lys Val Ala
1 5 10

c:

Leu Ala Ile Lys Gln Thr Ala Asn Thr Ala Thr
1 5 10

d:

Gln Gln Gln Thr Ala Pro Lys Ala Pro Thr Glu
1 5 10

e:

Ser Thr Pro Val Ala Pro Thr Gln Glu Val Lys Lys
1 5 10

f:

Pro Val Ala Pro Thr Gln Glu Val Lys Lys
1 5 10

g:

Gln Val Asn Asn Glu Val Ala Ala Ala Glu Lys Thr Glu Lys
1 5 10

h:

Glu Val Lys Gln Thr Thr Gln Ala Thr Thr Pro Ala
1 5 10

i:

Ala Ile Lys Gln Thr Ala Asn Thr Ala Thr Pro Lys
1 5 10

Fig. 3

Gln	Val	Asn	Asn	Glu	Val	Ala	Ala	Ala	Glu	Lys	Thr	Glu	Lys	Ser	Val	1	5	10	15
Ser	Ala	Thr	Trp	Leu	Asn	Val	Arg	Thr	Gly	Ala	Gly	Val	Asp	Asn	Ser	20	25	30	
Ile	Ile	Thr	Ser	Ile	Lys	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Glu	Thr	Thr	35	40	45	
Glu	Ser	Asn	Gly	Trp	His	Lys	Ile	Thr	Tyr	Asn	Asp	Gly	Lys	Thr	Gly	50	55	60	
Phe	Val	Asn	Gly	Lys	Tyr	Leu	Thr	Asp	Lys	Ala	Val	Ser	Thr	Pro	Val	65	70	75	80
Ala	Pro	Thr	Gln	Glu	Val	Lys	Lys	Glu	Thr	Thr	Thr	Gln	Gln	Ala	Ala	85	90	95	
Pro	Val	Ala	Glu	Thr	Lys	Thr	Glu	Val	Lys	Gln	Thr	Thr	Gln	Ala	Thr	100	105	110	
Thr	Pro	Ala	Pro	Lys	Val	Ala	Glu	Thr	Lys	Glu	Thr	Pro	Val	Ile	Asp	115	120	125	
Gln	Asn	Ala	Thr	Thr	His	Ala	Val	Lys	Ser	Gly	Asp	Thr	Ile	Trp	Ala	130	135	140	
Leu	Ser	Val	Lys	Tyr	Gly	Val	Ser	Val	Gln	Asp	Ile	Met	Ser	Trp	Asn	145	150	155	160
Asn	Leu	Ser	Ser	Ser	Ser	Ile	Tyr	Val	Gly	Gln	Lys	Leu	Ala	Ile	Lys	165	170	175	
Gln	Thr	Ala	Asn	Thr	Ala	Thr	Pro	Lys	Ala	Glu	Val	Lys	Thr	Glu	Ala	180	185	190	
Pro	Ala	Ala	Glu	Lys	Gln	Ala	Ala	Pro	Val	Val	Lys	Glu	Asn	Thr	Asn	195	200	205	
Thr	Asn	Thr	Ala	Thr	Thr	Glu	Lys	Lys	Glu	Thr	Ala	Thr	Gln	Gln	Gln	210	215	220	
Thr	Ala	Pro	Lys	Ala	Pro	Thr	Glu	225	230										

Fig. 4a

Met	Asn	Met	Lys	Lys	Ala	Thr	Ile	Ala	Ala	Thr	Ala	Gly	Ile	Ala	Val	1	5	10	15
Thr	Ala	Phe	Ala	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Ala	Ser	Thr	Val	Val	Val	20	25	30	
Glu	Ala	Gly	Asp	Thr	Leu	Trp	Gly	Ile	Ala	Gln	Ser	Lys	Gly	Thr	Thr	35	40	45	
Val	Asp	Ala	Ile	Lys	Lys	Ala	Asn	Asn	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Ile	Val	50	55	60	
Pro	Gly	Gln	Lys	Leu	Gln	Val	Asn	Asn	Glu	Val	Ala	Ala	Ala	Glu	Lys	65	70	75	80
Thr	Glu	Lys	Ser	Val	Ser	Ala	Thr	Trp	Leu	Asn	Val	Arg	Thr	Gly	Ala	85	90	95	
Gly	Val	Asp	Asn	Ser	Ile	Ile	Thr	Ser	Ile	Lys	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	100	105	110	
Thr	Val	Glu	Thr	Thr	Glu	Ser	Asn	Gly	Trp	His	Lys	Ile	Thr	Tyr	Asn	115	120	125	
Asp	Gly	Lys	Thr	Gly	Phe	Val	Asn	Gly	Lys	Tyr	Leu	Thr	Asp	Lys	Ala	130	135	140	
Val	Ser	Thr	Pro	Val	Ala	Pro	Thr	Gln	Glu	Val	Lys	Lys	Glu	Thr	Thr	145	150	155	160
Thr	Gln	Gln	Ala	Ala	Pro	Val	Ala	Glu	Thr	Lys	Thr	Glu	Val	Lys	Gln	165	170	175	
Thr	Thr	Gln	Ala	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Lys	Val	Ala	Glu	Thr	Lys	Glu	180	185	190	
Thr	Pro	Val	Ile	Asp	Gln	Asn	Ala	Thr	Thr	His	Ala	Val	Lys	Ser	Gly	195	200	205	
Asp	Thr	Ile	Trp	Ala	Leu	Ser	Val	Lys	Tyr	Gly	Val	Ser	Val	Gln	Asp	210	215	220	
Ile	Met	Ser	Trp	Asn	Asn	Leu	Ser	Ser	Ser	Ser	Ile	Tyr	Val	Gly	Gln	225	230	235	240
Lys	Leu	Ala	Ile	Lys	Gln	Thr	Ala	Asn	Thr	Ala	Thr	Pro	Lys	Ala	Glu	245	250	255	

Fig. 4b

Val	Lys	Thr	Glu	Ala	Pro	Ala	Ala	Glu	Lys	Gln	Ala	Ala	Pro	Val	Val	260	265	270	
Lys	Glu	Asn	Thr	Asn	Thr	Asn	Thr	Ala	Thr	Thr	Glu	Lys	Lys	Glu	Thr	275	280	285	
Ala	Thr	Gln	Gln	Gln	Thr	Ala	Pro	Lys	Ala	Pro	Thr	Glu	Ala	Ala	Lys	290	295	300	
Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ser	Thr	Asn	Thr	Asn	Ala	Asn	Lys	Thr	Asn	Thr	305	310	315	320
Asn	Thr	Asn	Thr	Asn	Asn	Thr	Asn	Thr	Pro	Ser	Lys	Asn	Thr	Asn	Thr	325	330	335	
Asn	Ser	Asn	Thr	Asn	Thr	Asn	Thr	Asn	Ser	Asn	Thr	Asn	Ala	Asn	Gln	340	345	350	
Gly	Ser	Ser	Asn	Asn	Asn	Ser	Asn	Ser	Ser	Ala	Ser	Ala	Ile	Ile	Ala	355	360	365	
Glu	Ala	Gln	Lys	His	Leu	Gly	Lys	Ala	Tyr	Ser	Trp	Gly	Gly	Asn	Gly	370	375	380	
Pro	Thr	Thr	Phe	Asp	Cys	Ser	Gly	Tyr	Thr	Lys	Tyr	Val	Phe	Ala	Lys	385	390	395	400
Ala	Gly	Ile	Ser	Leu	Pro	Arg	Thr	Ser	Gly	Ala	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	405	410	415	
Thr	Arg	Ile	Ser	Glu	Ser	Gln	Ala	Lys	Pro	Gly	Asp	Leu	Val	Phe	Phe	420	425	430	
Asp	Tyr	Gly	Ser	Gly	Ile	Ser	His	Val	Gly	Ile	Tyr	Val	Gly	Asn	Gly	435	440	445	
Gln	Met	Ile	Asn	Ala	Gln	Asp	Asn	Gly	Val	Lys	Tyr	Asp	Asn	Ile	His	450	455	460	
Gly	Ser	Gly	Trp	Gly	Lys	Tyr	Leu	Val	Gly	Phe	Gly	Arg	Val			465	470	475	

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Mittel und Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Listeria*, insbesondere von *L. monocytogenes*. Zu den erfindungsgemäßen Mitteln gehören Primer, deren Sequenz aus dem *iap*-Gen von *L. monocytogenes* ausgewählt ist. Weiterhin gehören zu den erfindungsgemäßen Mitteln Peptide, deren Sequenz aus dem p60-Protein ausgewählt ist, und die geeignet sind, spezifische Antikörper für den immunologischen Nachweis von *L. monocytogenes* zu erzeugen.